SURFACE-STRENGTHENING RAMAN SPECTRUM IMMUNOASSAY

Publication number: JP6174723 (A) 1994-06-24 **Publication date:**

PIITAA JIEI TAASHIYA: TOOMASU II ROA; JIEIMUSU JIEI Inventor(s):

MAAKASU; TEREEZE KOTSUTON; BAANAADO

ROSUPENDOUSUKI +

Applicant(s):

ABBOTT LAB +

Classification:

G01N21/65; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/543; - international:

G01N21/63; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/543; (IPC1-

7): G01N33/533; G01N33/543

- European:

G01N21/65D; G01N33/543K2

Application number: JP19930226084 19930910 Priority number(s): US19920944138 19920911

Also published as: JP3444630 (B2) 国 EP0587008 (A1) 团 EP0587008 (B1) GR3029912 (T3) 向 ES2129474 (T3) DK587008 (T3) DE69323459 (T2) 团 CA2105782 (A1) AU4625993 (A) AT176727 (T)

<< less

Abstract of JP 6174723 (A)

PURPOSE: To provide a method, a composition, a device an apparatus and a kit for determining the presence and the quantity of an analyte by observing an analyte-medium ligand bonding event in a test mixture containing an analyte to be assayed, and particles having a specific bonding position, a Raman active label and a surface inducing surface-enhanced Raman scattering. CONSTITUTION: A test mixture is irradiated with a radiation energy sufficient for emitting Raman spectrum being detected by a Raman-active label in the test mixture. The difference of detected surfaceenhanced Raman scattering spectrum depends on the quantity of analyte existing in the test mixture. Consequently, the presence and the quantity of analyte can be determined by observing the difference.

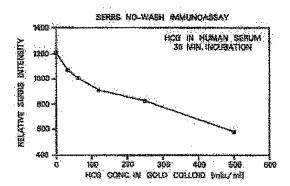


FIG.9

Data supplied from the espacenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開 特別公裝(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-174723

(43)公開日 平成6年(1994)6月24日

(51)Int.CI.* G01N 33/533 33/543 被別記号 厅内整理番号 8310-2 J 技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数20(全 21 頁)

(21)出願番号	特願平5-226084	(71)出願人 391008788	391008788
			アポット・ラボラトリース
(22)出順日	平成5年(1993)9月10日		ABBOTT LABORATORIES
			アメリカ合衆国80964-3500イリノイ州ア
(31)優先権主張番号 944138	944138		ポット・パーク、ワン・アポット・パー
(32)優先日	1992年9月11日		ク・ロード(番地の表示なし)
(33)優先権主張国	米冠 (US)	(72)発明者	(72)発明者 ピーター・ジエイ・ターシャ
			アメリカ合衆国、イロノイ・60046、ワイ
			ク・ピラ、ジエルデン・ロード・21651
		(72)発明者	(72)発明者 トーマス・イー・ロア
			アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガー
			ニー、フアーンデイル・ロード・985
		(74)代理人	(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 麦面強化ラマンスペクトルイムノアッセイ

物質の存在または日を検出するための方法、組成物、デ 得る表面を有する粒子を含む試験混合物中、被分析物質 ラマンー活性標識及び表面一強化ラマン光散乱を誘導し **- 媒介リガンド結合事象を観測することにより、被分析** 【目的】アッセイすべき被分析物質、特異的結合部位 装置及びキットを提供する。

する被分析物質の量に依存する。したがって、これらの ン散乱スペクトルに於ける違いは、試験混合物中に存在 な放射エネルギーを照射する。検出した表面-強化ラマ 標識が検出可能なラマンスペクトルを放出するのに十分 違いを観測することにより、被分析物質の存在または量 【構成】本試験混合物に、試験混合物中のラマンー活性

【特許請求の範囲】

【訓求項1】 被分析物質-媒介リガンド結合!染を刷測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出する方法であって、試験サンプル、特異 的結合部位、ラマンー活性標識並びに、被分析物質、も

に於ける違いを観測することを含む該方法。 に依存する、検出した表面一強化ラマン散乱スペクトル 照射し;次いで試験混合物中に存在する被分析物質の量 クトルを生むのに十分な放射エネルギーを試験混合物に 誘導し得る表面を有する粒子を含む試験混合物を形成 会合により錯体が形成される表面-強化ラマン光散乱を し、鉛体中、ラマンー活性標識に検出可能なラマンスペ しあれば特異的結合部位、ラマンー活性標識及び粒子の

あることを特徴とする。|||求項1に記載の方法。 【請求項3】 【請求項2】 **ラマンー活性標識が粒子にあることを特** ラマンー活性標識が特異的な結合部位に

徴とする請求項1に記載の方法。 【請求項4】 特異的な結合部位が粒子にあることを特 徴とする請求項1に記載の方法。

を特徴とする請求項2に記載の方法。 【請求項5】 標識化特異的結合部位が粒子にあること

とを特徴とする請求項3に記載の方法。 【清求項6】 特別的な結合部位が標識化粒子にあるこ

【請求項7】 特異的な結合部位が、特異的な結合部位 及び被分析物質からなる第1の特異的な結合対の一方で あることを特徴とする請求項1に記載の方法。

子の両方にあることを特徴とする請求項1に記載の方 [8 卧水觀] ラマン一活性標識が特異的結合部位と粒

【請求項9】 試験混合物がさらに第2の特異的結合部

ಜ

位を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。 【請求項10】 第2の特異的結合部位が、特異的結合 部位と被分析物質からなる第1の特異的結合対の一方で あることを特徴とする請求項9に記載の方法。

異的な結合部位と被分析物質からなる第2の特別的な結 異的な結合部位と異なることを特徴とする請求項9に記 合対の一方であり、第2の特異的な結合部位は第1の特 【請求項11】 第2の特異的な結合部位が、第2の特

マン光散乱を誘導し得る表面を有する第2の粒子にある ことを特徴とする請求項10に記載の方法。 【請求項12】 第2の特異的な結合部位が表面強化ラ 40

ることを特徴とする請求項12に記載の方法。 マン散乱が起きることを特徴とする請求項1に記載の方 【請求項14】 照射エネルギーにより表面強化共鳴ラ 【請求項13】 第1及び第2の粒子が同一物質からな

ことを合む語来項1に記載の方法。 【請求項15】 さらにエンハンサーを錯体に添加する

【請求項16】 試験混合物中の被分析物質-媒介リガ 50

8

特開平6-174723

標識化被分析物質-類似体の結合の程度が、被分析物質 の存在により影響されるように、標識化被分析物質-類 あって、試験サンプル、特異的結合部位により認識され 含む該方法。 面一強化ラマン散乱スペクトルの違いを観測することを 混合物中に存在する被分析物質に依存する、検出した表 分な放射エネルギーを試験混合物に照射し、次いで試験 性標識が検出可能なラマンスペクトルを発生するのに+ 中の結合した標識化被分析物質-類似体上のラマソー活 似体を粒子上の特異的結合部位に結合させ;試験混合物 子と接合した特異的結合部位を含む粒状捕獲試薬を含む び表面一強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を有する粒 活性標識につながっている標識化被分析物質-類似体及 を含み、媒介分子を介して直接または間接的にラマンー る被分析物質エピトープを発現する被分析物質-類似体 試験サンプル中の被分析物質の存在または山の測定法で ンド結合事象を観測することにより、体液から誘導した 試験温合物を形成し:粒子上の特別的結合部位に対する

20 に会合した粒子の分離段階をさらに含むことを特徴とす る請求項16に記載の方法。 【請求項17】 多孔性物質による、ラマンー活性標識

ラマン散乱が起きることを特徴とする請求項16に記載 【清求項18】 放射エネルギーにより表面-強化共鳴

加することを含むことを特徴とする請求項16に記載の 【請求項19】 さらに試験混合物にエンハンサーを添

獲部位に照射し:次いで試験混合物中に存在する被分析 位端へむかって試験混合物を動かし、検出可能なラマン スペクトルを発生させるのに十分な放射エネルギーを捕 物質上に載置し;キャピラリー作用により近位端から遠 **薬を含み、近位蜵及び遠位端を持つクロマトグラフィー** 質ー類似体に結合し得、捕獲部位に固定化された捕獲試 プルから試験混合物を形成し、試験混合物を、被分析物 した特異的結合部位を含む粒状捕獲試薬を含む試験サン る表面を持つ、ラマンー強化標識に会合した粒子に接合 分析物質一類似体、表面一強化ラマン光散乱を誘発し得 被分析物質の存在または量を検出する方法であって、被 ンド結合事象を観測することにより、試験サンプル中の 中の違いを観測することを含む該方法。 物質の量に依存する、表面-強化ラマン散乱スペクトル 【請求項20】 試験混合物中の被分析物質ー媒介リガ

【発明の詳細な説明】 [1000]

及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘発し得る表面 の新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明 物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試 は、試験サンプル、特別的綜合部位、ラマンー活性概認 験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するため 【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析

ම

を有する粒子を含む試験混合物中での、表面一強化ラマン院乱スペクトルの近い及び強化を追溯することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。

【0002】特定の分子(結合分子と称する)による他の特異的分子(リガンドと称する)に対して示される結合解析性は、サンプル中の特定の結合分子またはリガンでの最を測定するためのアッセイの基礎として通常利用される。

を「被分析物質:analyte」と呼称する。 出、同定または定量するためにアッセイ対象となる物質 定するための方法である。当業界の専門用語では、検 るため、及び/または(3)サンプル中の物質の量を測 存在を検出するため、 結合分子及びリガンドの特異的結合対を使用するアッセ は、検出方法として表面一強化ラマン光散乱によって、 的結合対の一方は、特異的結合部位と称される。本発明 与する2個の分子は、特異的結合対とも称される。特異 イを実施するのに使用する物質及びキットも包含する。 イを実施するための方法を包含する。本発別は、アッセ 【0004】アッセイとは、(1)サンプル中の物質の 【0003】結合分子一リガンド錯体を形成する際に関 (2) サンプル中の物質を同定す 23 0

【0005】リガンド結合アッセイは、医療診断に特に重要である。近代の診療に於いて、リガンド結合アッセイは、抗体、抗原、ホルモン、投寒、毒物(potsons)、毒素(toxins)、違法薬(illegal drug)等の存在を検討するために、患者の血液、尿、唾液等で日常的に、患者の血液、尿、唾液等で日常的

【0006】新規の、良好な、それ結高値でなく川つ迅速なアッセイは、ヘルスケアのレベルを向上し得る。こ 30のようなアッセイは、ペルスケアのレベルを向上し得る。こ 30のようなアッセイは、患者に関してより多く且つより優れた情報を医者に提供することができ且つ穏当なコストで実施し得る。さらに、アッセイをより容易且つより安値にすることにより、高レベルのヘルスケアを世界の発値にすることにより、高レベルのヘルスケアを世界の発展送上地域に伸展し得る。リガンド結合アッセイは、食展送上地域に伸展し得る。リガンド結合アッセイは、食度が、工災的生物学的方法及び生物学的研究の多くの領域に於いて、地下水の汚染、毒素及び殺虫剤をモニターするのにも使用される。

[0007]

【従来の技術】多くのアッセイでは、微量の特定の物質(低級分析物質)を、非常に多量の他の物質の存在下で検出日ご測定しなければならない。このようなことは、結合分子がリガンドに対して規和性が高く、他の物質の存在に関係なく、その特定のリガンドに関して高度の結合特異性が得られるため可能となる。最も一般的なリガンド結合アッセイは、イムノアッセイである。

【0008】イムノアッセイに於いて、抗体は、抗原と特異的に結合し、リガンドとして働く結合分子となり、これにより特別的な結合対を形成する。抗体/抗原結合量を測定するためには、特異的な結合対の一方を追跡可

能な物質で印をつけ、即ち標準にする。追喚可能な物質 の対数的な性質によって、検出または測定すべきその分 在、即ち、これに結合する特異的な結合解位の存在を検 出または測定する。特異的な結合対の標識化部分は、指 示薬と呼称される。

【0009】直接イムノアッセイでは、特定の結合対の他方に結合した指示薬の量を測定する。間接イムノアッセイでは、被分析物質による、特異的結合対の他方に対する指示薬の結合の肌に反を測定する。

(0010]特異的結合対のそれぞれは、抗原または抗体でなくてもよい。しかしながら、互いに銀利性を有する任意の2個の分子は、特異的結合対を含み傷、リガンドー結合アッセイの基礎を形成し得る。このような特異的結合対の他の例としては、レクチン及びこれらが結合する払合炭水化物、ホルモン及びそのレセプター、任のコフェクター分子及びそのレセプター、他の分子に特異的に結合するように分子構造設定され目つ合成された結合分子及びよ力の銀和性を有する他の分子(例えば、アビジン及びピオチン)が挙げられる。

【0012】EIAでは、その基質が存在する場合、検出可能な物質またはシゲナルをもたらす特異的な結合部位に結合する機識として酵素を使用する。この酵素--標識化特異的結合部位は指示薬として働き、その結合を検出するのに酵素活性を利用する。EIAにはRIAが持つ欠点の機つかがないが、EIAが洗は、検出可能な体料を反応を誘発するために基質物質を添加しなければならない。他の欠点としては、酵素安定性及び基質変異(turnover)速度は温度感受性であり、温度が上昇するにつれて酵素安定性は低下し、基質変異速度は増加する点が挙げられて

(0013) これらのアッセイ構成 (configuration) の総でに共通の欠点は、被分析物質に結合するものと未結合標識化試薬とを分離しなければならないということである。これは通常、アッセイを手動で実施するときには冗長な光浄段階が必要で用つ自動化形式では込み入ったロボット工学が必要である。

【0014】イムノアッセイは、自動化装置によっても 災施し得る。このような装置の例としては、本出類人か 50 ら市販されているTDx(商標)、IMx(商標)及びIMx SE

> LECT (登録商標) アナライザーが挙げられる。これらの 装置*を使別して、体液 (例えば、面が、面球及び全面) に於いて被分析物質濃度を測定する。lkx (商標) 及び! kx SELECT (登録商標) アナライザーは、Charles H.Kei lerら、"The Abbott Illx (商標) 及び!llx SELECT (登録 商標) システム"、J.C.lin. lemunoassay, 14,115,1991: 並びに此.Floreら、"The Abbott Illx (登録商標) 自動化 ベンチトップ免疫化学アナライザーシステム"、C.lin. Ch

em.,34,1726,1988に記載されている。

【0015】他の型のアッセイでは、所謂「試験片」及 び「フロースルー」方法を使用する。これらの方法を使 用して、試験サンプルを「試験片」または「フロースルー」 技器に適用し、被分析物質の存在は、着色反応により発生した視覚的に検出可能なシグナルにより表す。フロースルー 装置に適用し、被分析物質の存在は、着色反応により発生した視覚的に検出可能なシグナルにより表す。フロースルー 装がは通常、その上にがを形成したか、またはその中に含まれるマトリックス上の捕獲部位で固定化された試薬の付いた多孔性物質を使用する。試験サンプルを装置に適用し、多孔性物質を通して流す。サンプル中の被分析物質は、試薬と反応して多孔性物質上に検出可能なシグナルを発生する。このような装置は、被分析物質の存在を定量的に検出するのに有用であることが証明された。

【0016】近年、金属コロイド粒子を使用するアッセイ方法が開発された。標識すべき特異的結合部分を、吸着により金属またはコロイド粒子上に被覆し、金属粒子を標識とする。免疫反応によって固体支持体上にこれらの標識化結合部位を局在化することにより、視覚的に検出可能で担つ装置によって測定可能なシグナルを形成し行る。

【0017】蛍光及び可視染料及びスピン標識も、リガンド結合アッセイで標識として使用されてる。

【0018】これらの結合分子-リガンドアッセイは総て、各々欠点を有する。標識化特異的結合部位の存在を検出または測定する手段としてラマン光分散を使用すると、以下に記載するようにこれらの欠点の幾つかを避けられる。

【0019】 レイリー光分数

従来より、特定の分子が、光ビーム(例えば、紫外、可 根または近赤外)によって照射されると、入射光量子の 小画分は幾つかの分子によって瞬間的に保持され、これ の分子の幾つかのコネルギー単位が電子の基底状態よ りも高い極動単位に遷移することは公知であった。これ らの高い極動単位は、仮の状態と呼称される。殆どの場 合、これらは弾性衝突であり、分子は光量子を放出する ことによりその元の振動準位に戻る。光量子は入射光と 同一波長で全方向に放射(即ち、散乱)する。これをレ イリー散乱と呼称する。

【0020】ラマン光散乱

1928年、C.V.Ramanは、特定の分子に照射すると、光量 子を保持した分子のうちの少部分が、保持した光量子を

特開平6-174723

3

放出した後も元の振動準位に戻らず、電子の基底状態の 災なった振動率位に終ちることを発見した。従って、こ でもの分子から放出された放射エネルギーは、異なるエ ネルギー且つ異なる波長にある。これをラマン散乱と呼

23 射光量子よりも低い波長で散乱する光量子(ストークス いて、「基状態の分子数は、常に随起状態の分子よりも いエネルギー即ち長波長にある。これはストークスーシ 波長)に対して少ない。従って、通常分析されるのはス 高い被長で散乱する光量子(反ストークス被長)は、 率(odds)は非常に小さい。従って、入射光量子よりも っていた以上のエネルギーをもって散乱した光量子の確 かなり多いので、励起分子と相互作用し且つ衝突時に持 乱と呼称される。通常条件下、任意のセットの分子に於 る。この場合、 この過剰のエネルギーを付与し得るので、基底状態に戻 前に既に高い振動準位にあるとき、放出された光量子に ちると、放出された光量子は、吸収したところよりも低 フトラマン散乱と呼称される。分子が光量子を吸収する トークス彼反だある。 【0021】分子が電子の基底状態の高い振動準位に落 (且つ短波長) であり、反ストークスーシフトラマン常 放出されたエネルギーは、高エネルギー

【0022】このようにして分子に対して損失したエネルギー、即ちこれから得られたエネルギー 量を量子化すると、不連続の液長シフトを持つ分散した光量子が得られる。これらの液長シフトは、分光計により測定し得る。ラマン散乱とは、特定の分子を識別するための分析手法及び、分子構造を研究する手段として有用であるとよえられる。しかしながら、他の方法、例えば、赤外分光法ほどではない。

【0023】 共鳴ラマン散乱

30

ママン分光法に於ける重要性は、光源としてレーザーを使用することにより更新された。その強力な干渉光は、ラマン分光法の感度の欠点の幾つかを克服した。さらに、人場光の波長が分子の最大吸収波長またはその近くであると、分子内に電子並びに振動巡移が生じ、共鳴ラマン散乱を観察し得ることが知見された。共鳴ラマン散乱に観察に得ることが重視された。大鳴ラマン散乱に付随した振動エネルギーに違いを示す。しかしながら、共鳴ラマン散乱を使用すると、電子振動吸収は約1000倍も効率が高くなる。共鳴ラマン散乱から増加シゲナルを使用しても、分析手法としてのその有用性は、まだ比較的弱い。グナルのため履定されていた。しかしながら、近年、表面強化効果が発見され、ラマン散乱強度をさらに飛躍的に強化する手段が提供された。

【0024】表面強化ラマン散乱

分子を特定の金属表面に非常に近接(しかし、必ずしも接触しない)させると、ラマン光散乱の強度が非常に増加することが知りとされ得る。金点表iniは、微細金点粒子50で"荒くする:roughened"か、または被覆しなければ

9

ならない。金属コロイドも、このシグナル増強効果を示す。強度は数11万倍以上のオーダーに増加し得る。1974 という用語を作り出した。 年、Dr.Richard P.Van Duyneは、この効果を特徴的な現 象として最初に認識し、 「表面強化ラマン散乱」 (SER

い)として考えられる。入射光の波長の約1/10の直径の は微細なでにぼこを介む。これらのでにぼこは、球体 て電場を誘導する。 光量子は、金属の、非常に移動性電子を持つ粒子を介し これらの粒子が、最も効果的であると考えられる。入射 がSERSに寄与すると考えられている。第1に、金属表面 い。しかしながら、現在、少なへとも20の別個の事実 (コロイドに於いては、回転楕円体であるかそれに近 【0025】SERS効果の理由は完全には理解されていな

[0032]

も見掛け上増加する。 が増加する。この効果により、粒子近隣の入射光の強度 が増加して、分子の分散を誘発し、ラマン散乱光の強度 磁場強度を大きく増加させる。これにより双極子の振動 ラズモンの共鳴振動効果は、金属表面の近隣に於ける電 極子モーメントの誘導は、ラマン散乱源である。表面プ の振動電磁場を供給する。入射光による分子中の振動双 ラズモン:plasmon」と呼称される。入射光量子は、こ うに作成し得る。このような集合的振動電子群は、「プ に対して集合状態 (collective fashion) で振動するよ は、麦面電子群は、印加された (applied) 振動電磁場 【0026】金属表面または粒子の特定の形状に於いて 20

ラマン光の効率が非常に高まる。 に高める。この結果、表面一吸収分子により散乱された 面プラズモンに対して誘導または歪んだ双極子モーメン 力を増加させて光を散乱させると考えられる。他方、表 を誘導する。そのイメージが近接しているので、分子の ち、プラズモン上の影双極子)の表面上にそのイメージ 接した双極子モーメントを持つ分子は、反対の極性(即 トを持つ分子のこのカップリングは、励起の確率を非常 子は、分子イメージンングである。金属表面に非常に近 【0027】SERS効果に寄与すると考えられる第2の因 33

RS) 効果は、7桁以上大きいラマン散乱シグナル強度に と、より強力になる。得られた表面強化共鳴ラマン散乱 ることにより強化し得る。表面強化ラマン散乱効果は、 励起光の被長が放射される分子の主要吸収帯と共鳴する (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering : SER 【0028】SERS効果は、共鳴ラマン効果と組み合わせ 40

【0029】 <u>イムノアッセイへのSERSの適用</u>

分子にも適川されている。 化学反応を実施する。近年、ラマンー活性補欠分子団 に、物理及び分析化学者により用いられて電極表面上で SERS効果は、分子表面構造及び動力学を研究するため (prostheic groups) (例えば、へム) を含む生物学的

【0030】今日まで、免疫診断に対してはSERS法は適 50

分子は、異なるラマン分散特性を示し得る。 は無視し得る。異なる環境または異なる配向で結合した 強いシグナルに寄与し、溶液中に残ったシグナルの寄与 または近くで固定化したこれらのリポーター分子のみが な表面の近接会合に強く依存するので、SERS活性表面上 幾しかの特徴的な長所が得られる。SERSシグナルは好適 【0031】 免疫診断に於いてこの方法を使用すると、

Š 中、被分析物質、特異的結合部位、ラマンー活性標識及 分析物質の量に依存する違いを観測することにより被分 ラマン分散スペクトル中の、試験混合物中に存在する被 ーを試験混合物に照射し;次いで、測定した表面一強化 可能なラマンスペクトルを生むのに十分な放射エネルギ 及び粒子を介む、試験指合物中の被分析物質一媒介リガン とを特徴とする粒子の間に錯体を形成させることによ 提供する。 析物質の存在または量をアッセイまたは測定する方法を ド結合事象を観測し、錯体中のラマンー活性標識に検出 【発明の概要】本発明の一態様によれば、試験混合物 試験サンプル、特異的結合部位、ラマンー活性標識 表面一強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つこ

マン散乱スペクトルに於ける違いを観測することにより ۶ する被分析物質の量に依存する、検出した表面一強化ラ 可能なラマンスペクトルを生むのに十分な放射エネルギ 標識化被分析物質一類似体上のラマンー活性認識に検出 成することにより試験混合物中の被分析物質-媒介リガ る、標識化被分析物質-類似体、及び表面-強化ラマン 質一類似体の結合量は被分析物質の存在により影響され あって、粒子上の特別的な結合部位への標識化被分析物 物質-類似体を結合させる標識化被分析物質-類似体で がり、次いで粒子上の特異的な結合部位に標識化被分析 子を介して直接または間接的にラマンー活性標識につな ープを発現する被分析物質-類似体分子を含み、媒介分 または測定する方法を提供する。 試験サンプル中の被分析物質の存在または量をアッセイ ーを試験混合物に照射し:次いで、試験混合物中に存在 ンド結合事象を観測し;次いで試験混合物中の結合した 異的結合部位を含む粒状捕獲試薬を含む試験混合物を形 光散乱を誘発し得る表面を持つ粒子上に固定化された特 【0033】本発明のもう一つの態様では、試験サンプ 特異的結合部位により識別される被分析物質エピト

物を形成し、次いで被分析物質に結合し得且つ捕獲部位 捕獲 減楽と被分析物質を介む 減験サンプルやの 試験結合 識も有する粒子に接合した特異的結合部位を含む粒子状 化ラマン光散乱を誘導し得る表面及び、ラマンー活性標 アッセイまたは測定するための方法であって、表面一強 により、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を 中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測すること 【0034】本発明のもう一つの態様では、試験混合物

> に固定化された捕獲試薬を含む、近位端及び遠位端を持 る、検出した表面一強化ラマン散乱スペクトルに於ける いで試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存す 生むのに十分な放射エネルギーを捕獲部位に照射し;次 合物を移動させ;次いで検出可能なラマンスペクトルを いでキャピラリー作用により近位端から遠位端へ試験混 **つクロマトグラフィー物質上に、試験混合物を観賞し:次** 違いを観測する該方法を提供する。

のに使用すべき組成物を提供する。 析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、 試験サンプル中の被分析物質の存在または量を測定する 一強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持ち且つラマン - 活性標識で標識した粒子を含む、試験混合物中の被分 【0035】本が別のさらにもら一つの娘様では、 数点

び被分析物質用の特異的結合部位を含む該キットを提供 面一強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つ粒子;及 測定するためのキットであって、ラマンー活性標識;表 により、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を 中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測すること 【0036】本発則のもら一つの態様では、試験混合物 23

[0037]

中の被分析物質の存在または量を検出するためのアッセ ける違い及び変化を観測することによる、試験サンプル む、試験混合物の表面一強化ラマン散乱スペクトルに於 混合物中に被分析物質が存在すると、混合物から得られ ンプル、特異的結合部位、ラマンー活性標識及び、表面 るラマンスペクトルに影響すると考えられる。 イ方法、組成物及びキットを包含する。分散した粒子状 一強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を持つ粒子を含 【好ましい態様の説明】上記の如く、本発明は、試験サ

くの用語を定義する。 【0038】本発明の種々の態様の記載に進む前に、

【0039】定義

目的で投与したもの並びに違法目的 (illicit purpose s) で投与したものを含む薬剤、微生物、ウイルス及び 位(例えば、抗体)または特異的結合部位を製造し得る 質である。被分析物質は、天然に存在する特異的結合部 任意の抗原物質、ハプテン、抗体及びその組み合わせも 任意の物質であり得、被分析物質はアッセイ中で1つ以 川川は、本分別によって試験サンプル中で検出される物 本明細書中で使用する「被分析物質:Analyte」という 酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、診療 含む。被分析物質としては、蛋白質、ペプチド、アミノ 上の特異的結合部位と結合し得る。「被分析物質」は、 上記任意物質に対する抗体または代謝物質を含み得る。

店する物質を指すが、被分析物質に比べその交流反応性 は大きくても小さくてもよい。被分析物質一類似体は、 体」という用語は、被分析物質特異的結合部位と交差反 【0040】本明細書中で使用する「被分析物質ー類似

特開平6-174723

6

のエピトープ部位を持つ限り、改質被分析物質並びに被 分析物質分子のフラグメント化または合成部分を含み信 被分析物質類似体が当該類似体と共通の少なくとも1つ

ratope」と呼称される。 特別的な結合対の一方のその部分は、「パラトープ:pa 特異的結合事象時に被分析物質のエピトープと接触する ンド結合対の一方と接触する被分析物質の一部を指す。 ープ」という用語は、特異的結合事象時に、特異的リガ 【0041】本明細書中で使用する「被分析物質エピト

に結合し、これにより、特異的リガンド結合対の他方に して、被分析物質は、特に特異的リガンド結合対の一方 れるエピトープを含むため、特異的結合事象で特異的リ ープ、若しくは特異的リガンド結合対の一方により含ま 分析物質が構造、または構造と似ているか同一のエアト の双方間の特異的結合事象を指す。この影響は通常、 の存在及び量により影響される、特異的リガンド結合対 結合することはなくなる。 ガンド結合対の他方によりその識別がなされる。結果と リガンド結合事象」という用語は、結合量が被分析物質 【0042】本明細書中で使用する「被分析物質-媒介

引き続き被分析物質に結合し得るアッセイで使用し得 は、アッセイで使用し得る。例えば、補助的な特異的総 合部位」という用語は、捕獲試薬及び指示薬の特異的結 合部位は、指示薬が補助的な特異的結合部位に結合し、 体の一部となる。1つ以上の補助的な特異的結合部位 合以外に使用される特異的結合部位であり、最終結合錯 【0043】本則細,『中で使用する「補助的な特別的編

30 濁した粒子が固まりに集まる反応を意味する。 【0044】「凝集:agglutination」は、液体中に懸

互いに近接保持されている事を意味する。 ated」とは、2個以上の分子及び/または粒子の状態が 【0045】本明細書中で使用する「会合した:associ

e」とは、一方の部分と他方が化学結合することにより る特異的結合部位である。固相捕獲試薬錯体は、アッセ e reagent」とは、実質的に固体の物質に直接または間 の反応生成物及び、化学的に活性化したラマンー活性標 血清アルブミンと化学的に活性化したテオフィリン分子 形成した物質を指す。このような種の例としては、ウシ イの結合及び非結合成分を分離するために使用し得る。 接的につなぎ得る、被分析物質または指示薬と結合し得 【0047】本明細書中で使用する「接合体:conjugat 【0046】本明細書中で使用する「捕獲試薬:captur

50 は懸濁液中の粒子または溶解性物質の中の結合(bindin hancer」とは、試験混合物中に存在するとき、溶液また 【0048】本明細書中で使用する「エンハンサー:en

識と、蛋白質分子 (例えば、抗体) またはリガンド

えば、ビオチン)との反応生成物が挙げられる。

g)、会合(association)または凝集を助ける任意の物

3

塩、例えば、塩化ナトリウム;所望のpHを保持するため の機構により作用する。エンハンサーの例としては; ポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定 に働く任意の型の緩衝液;糖;及びポリマー、例えば、 溶媒または凝集特性を変化させることによってまたは他 質である。エンハンサーは、液体媒質のpil、イオン性

検出可能な標識を含む。 的結合部位または金属表面に直接または間接的についた 【0049】本明細書中で使用する「指示薬」は、特異

ening molecule」とは、特異的結合対部位及びラマンー 活性標識の両方がついている任意の物質である。 【0050】本明細書中で使用する「媒介分子:interv

中に分散可能で、二つ表面一強化シャン光散乱 (SERS) くは銀のコロイド;金、銀、銅、若しくは伝導帯電子 支持する任意の物質である。粒子の例としては、金若し または表面一強化共鳴ラマン光散乱 (SERRS) の現象を (conductance band electrons) を示す任意の物質の粒 【0051】本明細書中で使用する「粒子」とは、液体

形のエネルギーである。 性標識により表面一強化ラマン光散乱させる、電磁波の 生させ、且つ粒子表面と会合した金属表面もラマンー活 その中のラマンー活性標識によりラマンスペクトルを発 radiation」という用語は、試験混合物に適用すると、 【0052】本明細書中で使用する「放射エネルギー: 質のフレークまたは粒子も好適な粒子となる。 導帯電子を示す物質で被数した伝導帯電子を示さない物 い。粒子表面はSERS及びSERRS効果と関連するので、伝 子またはフレークが挙げられるが、これらに限定されな

リポーター分子を含む。 指す。ラマンー活性標識の他の用語としては、染料及び 可能で検出可能なラマンスペクトルを出す任意の物質を するとき、存在する他の成分のラマンスペクトルと識別 識」という用語は、適当な波長の放射エネルギーを照射 【0053】本明細書中で使用する「ラマンー活性標

散乱)」が起きる。共鳴及び表面強化の結果、散乱が強 と共鳴状態にあるとき、「SERRS(表面強化共鳴ラマン 【0054】SERS活性表面で吸消質がレーザー励起波以

散乱に於ける増加を意味する。 定の金属表面の近隣の特定の分子により示されるラマン 【0055】「SERS (表面-強化ラマン散乱)」は、特

結合対としては、ビオチン及びアビジン、炭水化物及び ある。抗原及び抗体一特異的結合対以外に、他の特異的 列を検出するためのDMAハイブリダイゼーションアッセ レクチン、相隔的メクレオチド配列(ターゲット核酸配 より第2の分子に特異的に結合する2個の異なる分子で 一員、即ち、分子の一方が、化学的または物理的手段に (specific binding member) 」とは、特異的結合対の 【0056】本明細書中で使用する「特異的結合部位 8

> む) が挙げられる。 換えDNA法またはペプチド合成により形成したものを含 部位としては、抗原、ハプテン、抗体及びその針体(細 分析物質の誘導体またはフラグメント、即ち、被分析物 的結合部位の類似体であるものも含み得る。例えば、被 ピトープを持つ限り使用し得る。免疫反応性特異的結合 質-類似体は、被分析物質と共通の少なくとも1個のエ 挙げられる。さらに、特異的結合対としては、元の特異 一分子、酵素補因子及び酵素、酵素阻害剤及び酵素等が む)、札補的ペプチド配列、エフェクター及びレセプタ イで使用するプローブと捕獲された核酸配列とを含

清アルブミンが挙げられる。 質である。安定剤の典型例としては、Tween 20、Brij 3 ように働く粒子(コロイドを含む)と一緒に使用する物 加剤として、懸濁液中では粒子が会合する傾向を下げる 【0057】本明細書中で使用する「安定剤」とは、添 Triton-X 100、ポリエチワングリコール及びウショ

明に適用するために使用する試験サンプルと他の物質と 削残流を含むが、これらに限定されない。 ル、例えば、地下水若しくは廃水、土壌抽出物及び殺虫 清、血漿、唾液、精液、尿、他の体液及び環境サンプ 任意の物質を含み得る。試験サンプルの例としては、血 分析物質ー類似体を干渉しない限り、被分析物質以外の 流を含む)であり得る。試験サンプルは、他の物質が特 持ち得、任意の大きさまたは容和 (例えば、液体の移動 に他の成分を含み得、液体、または固体の物理的特質を を含むサンプルを指す。試験サンプルは被分析物質以外 は、本発明を用いて検出及びアッセイすべき被分析物質 ペクトルを発生し得る表面を持つ粒子等が挙げられる。 合部位、補助的な結合部位、被分析物質一類似体、ラマ の混合物を指す。これらの物質の例としては、特異的結 は、試験サンプル中の被分析物質を検出するために本発 異的結合部位の特異的結合または被分析物質若しくは被 ンー活性標識、緩衝液、希釈液及び表面一活性ラマンス 【0058】本明細書中で使用する「試験混合物」と 【0059】本明細書中で使用する「試験サンプル」と

DAB. HABA. 2- [4-ヒドロキシフェニルアゾ] 安息香酸 【0060】 緊語 p-ジメチルアミノアゾベンゼン

IgG. HTSH. ヒト甲状腺刺激ホルモン. 免疫グロブリンG.

DAB-ITC. 4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-イソチオ TMBSA. 2,4,6-トリニトロベンボンスラギン概 PBS. ウシ血清アルブミン. リン酸塩で緩衝させた生理食塩水

DMF. ジメチルホルムアミド

1.1. 国際単位.

と4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4 -イソチオシアナー ビオチンーBSAーDAB ビオチニル化ウシ血清アルブミン

> DMP ジニトロフェニル. トとの接合体

ಭ

DNB ジニトロベンボン DMP-BSA ジニトロフェニル化ウシ血清アルブミン.

もう一つの好ましい態様

チック、酸化物など)で被覆し得る。 的な結合部位がついた別の1種の物質(シリカ、プラス 体の形状を取り得た。強化できる表面または層は、特異 持するように活性物質(例えば、銀、金等)で被覆した どの他の物質、または上記のラマン散乱の表面強化を支 は成形した)片、スライド、ストリップ石しくは球体な ed) 構造 (裁断した、腐食させた、凹みをつけた若しく ガラス、紙若しくは巨視的には平坦若しくは織(textur 々の構造体とするか、あるいはシリカ、プラスチック、 滴、即ち水銀)、フレーク、または他の比較的小さい個 若しくは粒子(例えば、分散したコロイド、粒子、液 多くの金属物質及び形態を、SERS活性表面のために使用 繊維の形であってもよい、金属のための不活性支持構造 等)は、平均な表面(拡極、ストリップ、スライド等) し得る。これらの物質(例えば、銀、金、銅、プラチナ

たは球体で被覆し、次いで銀で被覆した銀被覆表面と同 リカ格子 (grating) は、衝撃若しくは杭で荒くし、 ティングにより支持体上に沈積し得る。銀被覆したレプ る。以下の火焔例に示すように、銀粒子は、溶液から支 は、金属の固体片の表面を電気化学的に「粗面化」し得 小さな粒子に分割することにより達成し得る。実際に ならない。これは、導電性金属 (通常、銀または金) の内在エネルギーが分散しないように局在化しなければ SERS効果を与えるためには、その表面プラズモンは、そ 常、表面強化に必要であると考えられる。表面に強力な 様に強いSERS強化が可能である。 持体に沈積し得るか、銀は、蒸発若しくはスパッタコー 【0061】光肺起可能な表面プラズモンの存在は、通

いる。SER (R) Sの読取とコロイド試薬を組み合わせる アッセイに紹合のよい表面は、金属コロイド形の粒子で ッセイを実施することができる。 と、現在の臨床化学分析で使用するのと同様の方法でア と、容易に取り扱い得る液体媒質の長所を持ち合わせて ある。金属コロイドは、非常に強力なSER(K)S活性 【0062】本発明に特に合致したSER (R) Sベースの

を還元することにより製造し得る。種々の還元剤、例え 公知である。金属の分散液は、所与の金属の希釈塩溶液 いるコロイドも、SERS及びSERRS効果を提供することが の銀または金から構成されているが、これらの金属に限 ば、アスコルベート、シトレート、水素化ホウ素または 定されない。例えば、鍋やその他の金属から構成されて SERRSスペクトルの様相及び強度に影響し得る。しかし 水系ガスを使用し得る。製造法は、得られたSERSまたは 【0063】本発明で使用する金属コロイドは、元素状

特開平6-174723

8

ば、粒子及びスペクトルが異なっていても使用し得るこ 種類のラマンー活性標識、即ち染料メチレンブルー及ひ て、火焔例20は、シトレート選元及び水素ガス還元に ながら、これは本発明を限定する因子ではない。 とを示している。 オキサジン725の20:1混合物のSERRSスペクトルによれ より製造したコロイドの別個のサンプルに吸着させた 2

2 40 છ 近すると、安定化剤濃度は、その分離距離の関数として の場合、「ポリマー性」という用語は、合成ポリマー分 に少なくとも膨削可能であるかまたは溶解性である。 n)とは区別される。これらの部分は、殆ど通常、 場合、還元剤及びその酸化副生成物、特に酸化金属アニ は、特に、還元剤を除去するか、還元剤が低濃度である い。立体安定化の原理は、Donald H.Mapper, "Steric S 作用しない限り、通常、連続相のイオン強度に敏感でな が得られる。構造安定化は、安定剤の溶解特性に大きく 和性非-溶媒懸濁液を添加すると、同様の非-安定化効果 剤の溶解性は低下し、従ってその有効性も低下する。 子に固定した安定化部分である場合、この一例が発生す た。ポリエチワンオキシドが水中に懸濁したコロイド粒 化部分を懸濁媒質中にそれほど溶解性でないようにでき れ、これにより粒子の動力学エネルギーが増加し、安定 化の有効性を低下できた力の例としては、熱が挙げら 粒子を合体または会合させる傾向が低下する。構造安定 くなく、従って、これらの作用を克服し得る力がないと の出来事は、浸透圧及びエントロピー的観点から好まし 域に於ける溶解性鎖の配列の度合いが増加する。これら 2個の粒子の間の領域で増加する。これにより、この領 の粒子に関して。説明できる。 この2個の粒子が 心に接 単には、その表面についた溶解性安定化部分を持つ2個 は、コロイド粒子の表面に結合している。この機構の簡 ド若しくは炭水化物)を指す。実際には、安定化部分 ド)、または天然高分子(例えば、蛋白質、ポリペプチ 子(例えば、ポリスチレン若しへはポリエチレンオキシ 的にポリマー性であり、分散液の連続(即ち、溶媒)枆 という点で静電的安定化 (electrostatic stabilizatio れている。立体安定化は、安定化部分が帯電していない 機構は、立体安定化(steric stabilization)と呼称さ 載されている。懸濁液中のコロイド粒子の安定化の他の mistry. Marcel Dekker, 1977, 第9~11年過期に記 的であると考えられる。このような機構の詳細は、Pau ている。これらの場合にコロイドの安定化機構は、静電 オン由来のアニオンに由来する負に帯電した表面を持っ 7により適切に記載されている。 tabilization," J.Colloid Interface Sci.,58,390 197 C. Hiemenz, Principles of Colloid and Surface Che 【0064】通常、これらの還元法で製造したコロイド 本質

50 乏 (depletion) 安定化である。この方法は、溶解性安 【0065】コロイド粒子の安定化の第3の機構は、空

9

特異的な官能基への金属の特異的な化学的相互作用が起 料別的な y - グロブリン)は、ラマン - 活性概識または 剤 (例えば、Tween 20若しくはBrij 35) または天然の するのが望まして、これが粒子に付着して、立体安定化 和性を有し得るが、チオールよりも弱い相互作用である **| 西表面で還元されてチオールを形成し、これが金属表点** スルフィド部分をコロイドに添加可能であり、多くは金 用がある。還元条件下で合成した金属コロイドでは、ジ 化学吸着結合を形成する銀表面へのチオール基の相互作 きる。金属に対する化学吸着の一例としては、銀一硫黄 により金属につけることができ、これにより、標識上の る。これらの標識は、簡単な疎水性吸消または化学吸消 標識に接合するか、または会合する、「染料またはリポ る。例えば、本発明は、構成成分として、ラマン一活性 各々の安定化機構によりそれぞれ異なった影響を受け 使用するのに最も好ましい。これらのコロイド粒子は、 erface Sc1.,75,525,1980に適切に記載されている。 ization and Depletion Flocculation," J.Colloid Int bert l.Feign及CFDonald H.Napper, "Depletion Stabil 一種の濃度の空乏から安定化が生じる。この方法は、Ro らが非常に近接していると、粒子の表面間の遊離ポリマ マーを分散媒質中に溶解させるだけで実施し得る。これ **にある必要がない。この種の安定化は、非イオン性ポリ** 定化部分も使用するが、これらは、コロイド粒子の表面 安定剤(例えば、アルブミン、_γ-グロブリン若しくは 果に対して感受性ではない。実際、市販の非イオン安定 定化となり得る。これらの安定化段階は通常、イオン効 を提供できたり、溶液中で独立したままなので、空乏安 アミノ基)を含んでいると、電荷の中和が起きてコロイ と通常考えられている。標識を負に帯電した金属コロイ で化学吸着される。アミノ基も、特定の金属表面上に親 イムノアッセイで特異的な結合成分としても作用し得る ドが凝集する。これらの場合、分散媒質に安定剤を添加 ドに添加すると、この標識が反対の電荷の基(例えば、 **ーター分子」とも参照される金属コロイドを使用し得** 【0066】本質的にコロイドである粒子は、本発明で 30 20

の場合、放射強化は10倍増加すると考えられており、2 も一桁は大きい範囲である。H.Metiuの"Surface Enhan に現れ、球の間の局部電界の二乗は銀の場合、単球より 示している。新しい共鳴は単球の場合よりも低い周波数 球としての挙動の明らかな重複とは非常に異なることを る励起スペクトル及び局部電界 (local field) は、単 てられている2個の小さな (レイリー服界) 球体に関す rface Sci.,110, 189, 1981の計算では、短い距離で隔 は、単球付近に配置された分子よりも100倍以上であっ 個の銀球の間に配置された分子の強化ラマンスペクトル 1.17,pp.153-320,1984の総説では、その238ページにこ ced Spectroscopy" ,Progress in Surface Science,vo 【0067】P.K.Aravind、A.Nitzan及びH.MetiuらのSu 50

> 論の実証を志す測定では避けるべきであると指摘してい ロイド系の電気力学的挙動を根本的に変更し得、単球理 たことを記載している。H.Mettukt、粒子の凝集は、コ

いるような懸濁液の電気力学的挙動が、染料標識のSERR と被分析物質との相互作用により加減されたコロイド粒 る。これは、コロイド表面で固定化されるその結合部分 S挙動により検出可能な方法で変化することは推測し得 た。従って、以下のアッセイ火施例に於いて、記載されて 相補的特異的結合部位を添加することにより影響を受け 会合したラマンー活性標識のSEERSスペクトルは、その た金属コロイドの表面の近くに配置された、即ちこれに 子の会合によるものであるう。 【0068】本研究に於いて、特異的結合部位と会合し

接続 【0069】2. SERS-活性表面への特別的結合部位の

に被覆された特異的結合部位の共有結合的接続により、 続、特異的結合部位への共有結合的接続により、または により、SERS一活性表面に特別的結合部位を接続し得 若しくはリンカーアームの遠位部分の強化表面への挿入 直接若しくはリンカーアームを介してSERSー活性表面上 直接吸着、媒介分子若しくはリンカーアームを介する接

【0070】3. ラマンー活性標識

要により化学的に修飾し得る安定で、簡易で、安価な分 ッセイで使用する酵素と異なり、これらの標識種は、必 る多くの分子であれば、いずれでもよい。酵素イムノア ラマンー活性標識は、特有のラマン散乱パターンを有す 子であり行る。

率を高める。 【0071】以下の特徴は、この適用に於ける標識の効

吸収帯 (励起係数は10 に近い) であること: 【0072】(a) レーザー励起被長の近傍にある強い

4 (b) 特異的な結合部位に共有結合し得る官能基である

染料の添加前に添加し得る。

範囲の検出限界を有すること; (c)光安定性であること; (d)十分な表面及び共鳴強化により、サブナノグラム

との間の結合相互作用の干渉が最小であること;

(e) 標識化特異的結合部位と未標識化特異的結合部位

(f) 使用した励起ー液長での強い蛍光放射が最小であ

(g) 幾つかの強いピークを伴う比較的簡単な散乱パタ

ーンであること;及び/または (f) 散乱パターンを持つ標識が互いに干渉せず、幾つ

1、ディスパーズオレンジ3、HABA(2-(4-ヒドロキシフ 性 フクシン、シカゴスカイブルー、ダイフクトフッド8 ニルアルソン酸―ナトリウム塩、アルセンアゾ 1、塩基 かの指示分子を同時に分析し得ること。 【0073】以下の、4- (4-アミノフェニルアゾ) フェ

か、または付着若しくは会合し得る。 た標識は、当該特異的結合部位に共有結合的に接続する ラマンー活性標識の有能な候補の総てではない。選択し -ジニトロベンガン、クレシルバイオレット及びp-ジメ チルアミノアゾベンゼンなどが列挙されるが、これらが ブルー、ポンソーS、ポンソーSS、1.5-ジフルオロ-2.4 ェニルアゾ)-安息香酸)、エリトロシンB、トリパン

【0074】4. 励起源

なレーザーの使用寿命は50,000時間以上であり得る。 好まして観点に於いて、ワーガーは通過類として作用す またはダイオードレーザー) であってもよい。このよう る。フーザーは、安価な型(例えば、ヘリウムーネオン

用して、IRスペクトルまたは近IRスペクトルで励起し、 色光である必要はなく、高強度である必要もない。 ラン 蛍光干渉を最小とする。使用した鴟扈遊は、必ずしも単 プも使用し得る。 【0075】一態様に於いて、ダイオードレーザーを使

ent) 液長により励起され得る。 はプラズモンー括性表面の下の導液管から消失(evansc 【0076】SERS効果は、表面の直接照射により、また

【0077】5. 接合体

被分析物質を同時分析できる。 セイで混合すると、同一サンプル中にある数種の異なる は、別個の散乱パターンを持つ。これらの接合体をアッ 位から製造でき、異なるラマン活性標識を持つその各々 数種の異なる接合体を、種々の特性を持つ特別的綜合部

【0078】6. 検出

いて、基本装置は、特定の波長に於ける光散乱強度を測 定しなくてはならない。ストークスシフトの大きいラマ クグラウンドの存在下で、波長がずれた散乱の強度を測 定するものである。SERSは、励起ビーム由来の強いバッ これらは通常、種々の型の分光計を用い得る。SERSに於 ラマン散乱を検出するには、数種の方法を使用し得る。 ンー活性物質を使用すると、この測定が容易である。

ミラー、フィルタまたは散乱した光を集めるためのホロ の熱分が結解された。これらの例としては、波以道状色 グラフ光学素子を使用することも包含する。 【0079】読取装置をさらに簡易化するための幾つか

の角度も検出器の位置も重要ではない。通常は、垂直に リガンド結合アッセイを実施することも可能である。 光学導液管により得た消失液を使用するSERS-ベースの であり、これによりサンプル固有の蛍光をカットする。 検出が標準である。SERS励起は、近赤外領域で実施可能 して実施されており、ビームに対して90°か180°での 対し60。にレーザービームが入射する平坦な表面を使用 【0080】SERSを使用すると、表面への入射光ビーム

延なく所望の間、データを収集し得る。シグナルは、光 非常に強力で化学的変化が起きない限り、シグナルの近 ナルの発生 (develpoment) 時間は必要なく、励起光が 【0081】照射時に読取が直ちに開始するので、 ツガ

<u>e</u>

特開平6-174723

る。SERSー活性表面近くの蛍光分子は、実際に表面-消 **ラマンリポーター基数を増加させることにより強化し得** uench) ではないので、シグナルは、プローブ分子上の 殊と異なり、SERSリポーター基は、自己一消光(self-q 学吸収に依存する系に於いては重複できない。 蛍光読取

本発明は自動分析器に適用きる。本装置は別個のストー 【0082】7. 数量構成

10 計が可能である。 置よりも安価なコスト及びより簡素で好適な分光計の設 ば、ホログラフ光学素子)により、研究室グレードの装 系の必要はない。光学技術に於ける近年の進歩(例え クスーシフトスペクトラ線を制造するのだ、粘巧な三句

20 cy) は、10%未満である。上記した光学物質及び成分の 典型的な単色光系の1段階以上のフィルタの代わりにす る。10°のオーダーの遮蔽能力の新しいフィルターを 進歩により、幾つかの特異的スペクトル線のみを測る簡 されている典型的な単色光の光学効率 (optical effier イオード検出器を含む。研究室グレードの分光計で使用 用されている数種のSERRS分光計は、シリコンフォトダ 超高感受性光量子計数装置を必要とする。実際、現在便 ると、かなりコストを削減できる。 先の主要な問題の一し、ワイン一般起義の過剰でも因す 単な分光器の光学効率を2~3倍増加し得る。これは、 【0083】SERSの結果として光学読取エネルギーは、

【0084】8. 分析用装置

ಆ 40 について米国特許第4,094,647号、同第4,235,601号及び ば、Deutschらは、クロマトグラフ試験ストリップ装置 66,241号、欧州特許第88,636号、同第259,157号及び同 688号、同第4,517,288号、同第4,740,468号及び同第4, に記載されている。 Zukら、 明細書中参照として含まれる。Deutschらの装置に対す 分析物質を分析する通常技術は、従来公知である。 第267,006号も重要である。 umentation",Clin.Chem., 31, 1144, 1985は、アッセ aphy, A quantitative Imunoassay Requiring No Instr る変形は、米国特許第4,366,241号及び同第4,186,146号 クロマトグラフ結合アッセイにより試験サンプル中の被 イ原理についてさらに記載している。米国特許第4,298 同第4,361,537号に記載している。これらの文献は、 "Enzyme Immunochromatogr

(実施例) [0085]

[0086]

Type 124) から切り出した水温片であった。 ンチ×4インチ×20ミルの水晶基材(GeneralElectric から切り出した平坦なつや消ししたガラス片または 4 イ 支持体表面一銀フィルム用の支持体は、顕微鏡スライド

50 【0087】 <u>化学的沈着</u>ーNi及びCotton(Anal.Chem.

することにより、スライドは蒸留水中で1週間まで安定 露する前、数時間蒸留水中に保存した。この方法を使用 **秒間超音波処理した。次いでスライドを吸着質溶液に暴** nicator.Model B22-4,125W)した。 以終的に、 鎖一被殺 に1分間設置し、次いで1分間超音波処理(Branson So から外し、室温に放温させた。ビーカーを水浴 (55°C) のAgOH沈澱が形成した。この段階の次に、濃Nh,OHを滴 液を約10滴添加することにより製造したもので、濃茶色 試薬を使用して銀を沈着させた。Tollen試薬は、小さな 元することにより支持体表面に銀を沈滑させた。Tollen 58, 3159, 1986) により既に記載された硝酸銀を化学選 であることが知見された。 意深へ渦巻かせながら添加した。ついでパーカーを氷浴 た。10% D-グルコース3mlを、確実に混じるように注 入れられるテフロン製枠に設置し、Tollen試薬中に入れ 及び蒸船水で洗浄したつや消ししたスライドを15枚まで ビーカー中、10mL 2~3 %AgNOa 溶液に新しい 5 %NaOH溶 したスライドを蒸留水で数回洗浄し、再び蒸留水中で30 llen試薬を含むビーカーを氷浴中に設置した。予め硝酸 下添加すると、この時点で沈澱が再溶解した。透明なTo 8

かになり、その幾つかは高さ10°nmに達していた(図 横断する粗面試験機プローブにより、多くの突起が明ら 質の粗面度は約130nmの厚さであることが知見された。 ることが明らかになった。鏝を引っ掻く操作により、基 面から、直径約100nmの一部融合した長球面になってい 1)。 尖針で表面を引っ掻くことによりできた銀層の断 微鏡により完く、粒状であることが知見された。表面を 【0088】表面は透過光では黄色であり、走査電子顕 【0089】 スパッタコーティングー銀ターゲットから

6.75cm離して、2.25rpmで4.5分回転させながら、Perkin

ಜ

混合物を24時間撹拌し、3000×gで20分間遠心分離し

ブミン (200mg) 及びNa2 CO; (10g) の溶液と混合した。

(2ml) の溶液を、蒸留水 (100ml) 中のウシ血清アル

-Elmer Randex Model 2400-85Aを使用してスパッタコー

ティングにより、水晶片を銀75オングストローム層で被

励起力200W及びアルゴン流速12.25cc/分を使用

言が明るかになった。

倍に拡大した走査電子顕微鏡から、微粉の特徴のない表 した。銀フィルムは透明で、透過光では青かった。2500

は、25mC cm に写しかった。 としてPt電極を使用した。酸化段階時に通過した全電荷 を粗面化した。参照電極としてAg-AgC1電極、補助電極 段階からなる、骸化-還元サイクル(ORC)により電極 開始電位−550mV→+500mV及び−550mVに戻す往復電位 総て除去した。この段階の次に、0.1M Na SO,溶液中、 中で濯ぎ、超音被処理して、表面に付着したアルミナを mアルミナスラリーを付けて電極を磨き、次いで蒸留水 の寸法の長方形であった。グラインダーで、水中0.3μ シールすることにより構築した。露出面は、約2×10mm れらは、偏平に銀のワイヤをガラス管内にTorrシールで 【0090】銀電極一銀電極を、Ni及びCotton, J.Rama Spectroscopy, 19,429,1988に記載の如く製造した。こ

【0091】銀コロイドーLec及びMeisel,J.Phys.Chem. 50

> 86,3391,1982の方法を愛形して、銀コロイドを製造した。 前権銀90mgのアリコートを渋桁水500mlに溶解させ、 沸騰させた。 1%クエン酸ナトリウム溶液11mlを一せ、沸騰させた。 1%クエン酸ナトリウム溶液11mlを一 れた典型的な粒径は、20~80nmであった。 製せずに使用するために貯蔵した。この製造法から得ら ロイドが形成した。コロイドを室温に冷却し、さらに精 度に全部添加し、溶液を45分撹拌すると、この間に銀コ

[0092]

【火施例2】

染料-抗体接合体の製造 製造した。 ン-抗体接合体を、DMF中のエリスロシンーインチオシア のスペクトルと比較し、置換度を測定した。エリスロシ 接合体の紫外及び可視スペクトルを、DAB及び抗体単独 adex G-25 (流い) カラム (1×30cm) 上で現益した。 リコートを添加した。混合物を一晩撹拌し、次いでSeph ベンガン-4゚-インチオシアナート 1 mg/ml溶液の20#1ア メチルホルムアミド (DMF) 中の4-ジメチルアミノアゾ 抗体(2 mg)を1 %NaHCO。(pH8.6)2 mlに溶解させ、シ ナートの濃度が2.5mg/mlであった以外には、同一方法で

[0093]

【火焰炮3】

エタノール (150ml) 中の2,4-ジニトロフルオロベンゼ のジニトロフェニル基 (DNP) の接合形成 DNP-BSA接合体を形成するためのウシ血清アルブミンへ

口基の導入を示していた(データは示されていない)。 の強い振動帯は、天然BSAに固有のものではなく、ニト をNicolet 60 SX FT 赤外分光計で測定した。1340cm 以代カリウムペレットに圧縮して、その赤外スペクトル るまで凍結乾燥させると、136mgとなった。サンブルを 含んで室温で実施した。透析バッグの内容物を固体とな 場合以外は、総ての溶液中に0.02%アジ化ナトリウムを 々6時間2回透析した。透析は、最後の水2リットルの トルで各々6時間2回、最終的に蒸留水2リットルで各 水 (PBS) 6リットルで23時間透析し、次いでPBS 2リッ て、沈臧物質を除去し、上沿をリン酸料で緩徊させた場

4.6-トリニトロベンゼソースルホン数 (TMBSA) により BSAの置換度は、BSA及びニトロ-BSA接合体がそれぞれ2 れはTNBSA試薬とインキュベーション後でも増加しなか に於ける当初の吸収が1.2であった(DMP基由来)が、 1.5に増加した。DNP-BSA接合体の同一濃度では、330nm 均吸収は、遊離アミノ基が誘導体形成された結果 0 から 誘導される度合いを比較することにより定めた。TNBSA った。本質的にDNP-BSA接合体中の有効なアミノ基は総 との反応後、天然BSAの 1 mg/ml溶液の330nmに於ける平 て、Sanger試薬によりDNPで誘導体形成だきたと結論で

21

【火施例 4】 [0094]

親フィルムに吸着したDNP-BSA接合体によるSERSスペク

た。各々DNP部分(2×10°BSA)に以してDNB 10°N及 常に強いことを示しており、したがってそのDNP部分はS は、フィルム表面の島部分に対する後者の吸着能力が非 化ラマン光散乱の比強度に於ける4桁もの大きな違い NBとDNP-BSA接合体のDNP部分の間に知見された表面一強 びDNP-BSA 10″Mで同様のピーク強度が得られた。遊離D 体(図2B)を合む鍛簄液(bH8.6) 中たインチュスー 新しく製造した銀ー被覆スライド(化学沈積)を、 B溶液は、非常に弱いラマンスペクトル(図2C)を与 ERS強化を示し得る。鳥部分のないフィルムの10゜M DM トし、次いで両方の場合についてSERSスペクトルを得 ニジトロベンゼン(DNB)(図2A)またはDNP-BSA接合

[0095]

【実施例5】

表面-強化共鳴ラマン分光学を例証するためのラマン-古性染料の使用 20

=495nm)を有し、SERRSが可能である。 クトル吸収 (pH7でアビジンに結合するとき、最大吸収 ラマン光散乱を励起するのに使用し得る波長に主要スペ アビジン分子は、pH7.0でKa=5.8×10゚リットル/molの 視和力定数で染料HABA 4分子を結合する。この染料は

させるときに得られたスペクトルを示す。光散乱強度の 単一主要ピークが被数1406cm'で知見され、1549cm'に ショルダーが、1188及び1139cm'に弱いピークが知見さ は1610cm に、幾つかの小さなピークは1160~1491cm の非-存在下では、アビジンー被覆した銀フィルムは、 m'の大きなピークは、もはや知見されなかった。HABA に知見された。アビジンの非-存在下で知見された1406c 20分間、アバジン2.5×10。M容液中たインキュベート れた。図3Bのスペクトルは、銀フィルムをまず室温で 定した。図3Aは、HABAを銀フィルムの表面に直接吸収 から除去し、PBSで洗浄し、そのラマンスペクトルを測 でインキュベーションした。次いでフィルムをHABA溶液 なしで化学的に沈積した銀フィルムをHABAの3mM溶液中 この領域では認識し得るスペクトルはなかった(図3 る。これらの条件下では、ラマン散乱強度の主要ピーク 分間インキュベーションを継続して得られたものであ し、次いでHABAを約0.3mMの終濃度に添加し、さらに20 【0096】アビジンでの予備コーティング有りまたは

[0097]

【実施例6】

及びラマン温取

サンドイッチイムノアッセイに於ける染料-抗体接合体

銀電極を、1 %NaHCO1、pH8.6中20μg/ml抗-TSH抗体溶液

(3)

特開平6-174723

の1㎜アリコート中、37℃で1器艦/ンキュベートし

所の異なる場所で測定し、結果を記録した。得られた典 図6)。2つのプロットの比較から、SERRSの読取を使 った(図5)。同一標準試料を、変形した市販酵素イム る平均ピーク強度を使用して、シグナル対濃度曲線を作 の5種類の濃度に関して図4に示した。1151cm に於け 体1m1を含む試験管に移し、37℃でさらに1時間イ 回洗浄後、フィルムを40μg/mlの濃度で抗-TSH抗体接合 60 µ IU/n1中で37℃ 1 時間インキュベートした。PBSで 3 Abbott No.6207からのTSH抗体標準 0、 4、10、25または ートした。次いでフィルムを、Abbott TSH EIAキット、 次いでPBS中の1%BSAでさらに1時間37℃でオーバーコ 用して得られた応答は、ゼロ抗原標準に関して例外的に 型的なスペクトルの混和プロットは、試験したTSH抗原 ンキュベートし、再洗浄し、SERRSスペクトルを得た。 ノアッセイを使用してアッセイした(Abbott No.6207, 【0098】SERRSスペクトルは、各記権に治って5回

藝色演绎との国の組成の道いによるのだろう。 アッセイでは結果に影響しなかったゼロ標準試料と他の

[0099]

の読取は、再び試験しても不変だったので、酵素イムノ

られたものと似ていることが知見された。この高いゼロ 高い値である以外には、酵素イムノアッセイによって得

洗浄なしのイムノアッセイ 【実施例7】

mg/ml) 各0.015mlを添加した。抗体一被覆ゾルのpHを、 ロイド溶液の3.0mlアリコートのそれぞれに、抗-ヒト甲 分、30±5 m 粒径) に添加して、終濃度1 m とした。 **決限刺激ホルモン抗体(リン酸温の緩縮された呉永中 1** リン酸塩緩衝液で7.4に調節した。 1%アスコルビン酸溶液を、銀コロイド(※j0.02%固形

છ

ルと比較して $60 \mu 1.U./m 1$ HTSHを含むサンプルに関して 添加し、インキュベートした。20分後、表面一強化ラマ 抗-TSH(DAB-ANTI-TSH)接合体0.015mlを各サンプルに 中に含まれていた。p-ジメチルアミノアゾベンゼンー 添加した。第2のサンプルに、0μ1.U./mlHTST標準0.0 度を示した。 403cm、のフマンシフトに於けるシグナルが約2倍の強 は、DAB染料のスペクトルに於ける最強ピークである、 ンスペクトルを記録した。結果は、0 μ1.U./mlサンプ 15m1を添加した。両方の標準は、ブタ血清マトリックス 1.U./mlヒト甲状腺刺激ホルモン(HTSH)標準0.015mlを 【0100】抗存-被職ンプのサンプラの一した、604

[0101]

近赤外励起を用いる蛋白質-染料接合体に於けるSERSの

50 したBomem ラマン分光計を用いてSIRSスペクトルを記録 沿し、1.06mmに於けるNd:Yagレーザーからの励起を使用 化学的に沈積した銀フィルムを、キュベット中の水に漫

特開平6-174723

側)が得られ、これは、1400及び1144cm。のラマンシフ 使用した(図7の下側)。上記ブランクで使用した銀フ な使用し得るスペクトルはほとんど無かった。このデー mg/ml)も走査した。使用した濃度でノイズと区別可能 になかった。銀表山の非一存在下で、p-ジメチルアミノ データを控除すると、染料のSERSスペクトル(図7の上 イルムを、染料ー蛋白質接合体を含むキュベットに添加 タを加算してプロットし、実験に関してブランクとして アゾベンゼンーウシ血清アルブミン接合体の水溶液(20 した。ランダムノイズと識別可能なスペクトルは本質的 トに於いて強いラマン散乱を示した。 **し、ルトンスペクトルを測定した。ブルンク試験からの** 10

【実施例9】 [0102]

鹼で洗浄し、数回、蒸留水で濯いだ。フラスコにマグネ 60m範囲であった。 成したサンプルの電子顕微鏡分析から、粒子は直径50~ になった。凝集は視認できなかった。この方法により作 赤、最終的にラベンダー-赤に変わることにより明らか ウム溶液3.8mlをフラスコに添加した。20秒後にコロイ るまで加熱した。金塩溶液、次いで1.0%クエン酸ナトリ フラスコに蒸留水500mlを満たし、撹拌しながら沸騰す ロロ金酸三水和物 (0.058g) を蒸留水 5 mlに溶解した。 チックスターラーと加熱マントルを装備した。テトラク 清浄な1000mlの丸底フラスコをAlconox(登録商標)石 ドの形成が、明るい黄色溶液から以下の色:紫→灰色→ 20

【火施例10】

0.2g/1 カーボワックス 20Mで置換した。ペレットを綴 すると、はっきりとペレットになった。上濱を除去し、 1.7ml遠心分離管に移し、約5000×gで5分間遠心分離 キュベートつた。 インキュベーション後、 金コロイドや ベートした。インキュベーション後、10g/1のポリエチ やかに振盪しながら混合し、次いで室温で10分インキュ ル抗体25μ1を添加した。個なのコロイドサンプルを緩 ーナル抗体25μ1を、他方のサンプルにはモノクローナ 1サンプルに区分した。一方のサンプルには、ポリクロ NaC1中で1.00mg/m1に希釈した。金コロイドを2つの5m ナル抗体で他方はポリクローナル抗体)を、別個に5mM 異的に結合する2種類の抗体(一方はマウスモノクロー 試薬を用いる試験に於いて目的とする被分析物質)に特 0に調節した。ヒト絨毛膜ゴナドトロピン (HCG) (この 金コロイド(10.0ml)を0.02M Kz COsを用いてpH6.5~7 抗-HCG金コロイドSERRS試薬の製造(方法1) た。表面一強化ラマン散乱分光によりアッセイで使用す 浄を全部で3回線り返した。抗体を含むゾルを再混合し やかに振盪しながら再分散させた。この遠心分離及び洗 5mlのアリコートに添加し、これらを室温で1時間イン フングリコール (カーボワックス 20M) 溶液100μ1を各 5 6

> 等量を使用前に一緒に混合した。 るためのコロイド試薬を得るために、2種類のコロイド (ポリクローナルー被徴及びモノクローナルー被数)の

中10g/1, pH7.2) と置換した。 ペレットを緩やかに振盪 成した。上清を除去し、カーボワックス 20M (5mM NaCl ×gで5分間遠心分離すると、あきらかにペレットが形 W) 溶液300μlを各15mlのアリコートに添加し、これら 中10g/1のポリエチレングリコール(カーボワックス 20 ートした。インキュベーション後、5ml NaC1 (pH7.2) することにより混合し、次いで室温で10分間インキュベ 質)に特異的に結合する2種類の抗体 (一方はマウスモ させながら再分散させた。遠心分離を2回繰り返した ン後、金コロイドを1.7ml遠心分離管に添加し、約5000 を箕温で1時間インキュベートした。 インキュベーショ ナル抗体300μ1を添加した。各コロイドを緩やかに振盪 抗体150 µ 1を添加し、他方のサンプルには、モノクロー ンプルに分けた。一方のサンプルには、ポリクローナル N NaCl (pH7.0) 中で希釈した。金ゾルを2つの15mlサ た。モノクローナル抗体は、 $0.250\,\mu\,\mathrm{g/ml}$ の濃度に、 $5\,\mathrm{m}$ 濃度に、0.01Mクエン酸緩衝液 (pH5.3) 中で希釈し 個に希釈した。ポリクローナル抗体を、0.250 µ g/mlの ~7.0に調節した。ヒト絨毛膜ゴナドトロパン (HCG) 金コロイド (30.0ml) を、0.02M K (0)を使用してpH6.5 抗-HCG金コロイドSERRS試薬の製造(方法2) / クローナル抗体で他方はポリクローナル抗体)を、別

の等量を使用前に一緒に混合した。 ド(ポリクローナルー被覆及びモノクローナルー被覆) するためのコロイド試薬を得るために、2種類のコロイ した。表面一強化ラマン散乱分光によりアッセイで使用 が、今回は、上清を0.2g/1のカーボワックス 20M、86ml NaCl, pH7.2で置換した。抗体を含むコロイドを再混和

[0105]

HCGに関するSERRSの洗浄なしのイムノアッセイ

することにより迅速に読み取った。最強のピークは、64 オレット染料由来の表面―歯化ラマンスペクトルを記録 に、混合物をウエルから除去し、ミニ試験管に添加し、 クレシルバイオレット水浴液(1.35μg/ml)5μlを添 所与の濃度のHCG標準試料10μ1を添加した。これに金コ 縮HCGの小容量を大容量の血清に添加することを包含し HCG標準試料を、ブタ血清 O、31、63、125、250、500、 加した。懸濁液を渦巻かせながら混合し、クレシルバイ ロイド免疫試薬 $200 \mu l$ を添加した。試験を実施するため エルを試験用の混合チャンバとして使用し、各ウエルに あり、存在するHCGのレベルのみが違う。ミクロ滴定ウ ており、そのため各サンプル中の蛋白質の全量は同一で 1000及び2000m1.U./mlで作成した。この希釈操作は、濃

> 7.1nmの励起波長由来の591cm のラマンシフトであっ 少し、図8に示されるような標準アッセイ曲線が得られ た。測定したピーク歯皮は、HCG濃皮の因数に従って液

[0106]

ECGに関するSERRS洗浄なしイムノアッセイ

以下の変更点:

[0107]

径の環を自由に動くように付け、これらの2本の環が に付けた難と回じ換にこの践にからに2個の1イソチニ 環を融合させたガラス棒からなっていた。キーホルダー ーラー―式を、王水中―晩浸漬することにより予備洗浄 "撹拌棒:paddles"として働くようにした。フラスコ した。ガラススターラーは、端に直径1インチのガラス

然した。 内に反応液は黄色になり、灰ー緑色に変化し、最終的に 直後、1.0%クエン酸ナトリウム10mlを添加した。 **ラスコを撹拌しながらゆっくりと沸騰させた。沸騰開始** た。この水に、試薬グレードの硝酸銀90mgを添加し、フ 鈍い不透明な緑色で安定した。沸点近くで全部で45分加 5分以

[0109]

【実施例15A】

BSA分子 1 個当たり、平均して17個のテオフィリン分子 Αーテオフィリン20μ1を、ヒツジ抗-テオフィリン14μ1 酢酸エチル/テトラヒドロフラン/メタノール/水(1/1/2 を、0.02%クエン酸ナトリウム中210μg/mlに希釈した。 リウム中100μg/mlに希釈した。ヒツジ抗-テオフィリン を含むBSA-テオフィリン接合体を、0.02%クエン酸ナト テオフィリン接合体の間の免疫反応のSERRS検出法 と一緒に、37℃で10分プレ-インキュベートした。 /エチルジスルフィドからなる染料溶液を調製した。BS アニリン-4-アゾベンゾ-4-チオカルバモイルエチルアミ /2容積比)の混合溶媒中、約20μg/mlで、N,N-ジメチル

特開平6-174723

【実施例13】

1. HCG標準減料はブタ血消の代わりにヒト血消で作

. 各標準 5μ 1を、 10μ 1の代わりに各ウエルに添加し

を図りに示す。 以外には、実施例12を繰り返した。標準アッセイ曲線

【実施例14】

1000m1のパイレックス製の丸底フラスコ及びガラススタ 20

及びスターラーを水道水を蒸留した水の約1000mlアリコ 当した蒸船水(18mhos伝導度)で5回発滑した。 ートで10回灌いだ。ついで、これをAlkonox(登録商 標)石鹸溶液で洗浄し、次いで蒸留水で10回以上洗浄 【0108】 フラスコに"Nilli-Q"水500mlを充填し ン、最終的にMillipore Milli-Q(登録商標)水系で製

ಚ

ヒツジ抗-テオフィリンとウシ血清アルブミン (BSA) — 5 40

キュベートした。インキュベーション直後で、表面-猫 った。次いで染料溶液 5 μ1を添加し、37°Cで90分イン で、銀コロイド0.5mlを添加した。凝集は視認できなか 帰属される強いピークを示した。 10cm'のラマンシフトに於いて、染料のジアン官能基に レーザーの励起を使用して記録した。スペクトルは、 化シマンスペクトルを、488mmに於けるアルゴンイオン

[0110]

【火爐例15B】

ŏ

アッセイ条件を実施した。ラマンスペクトルの記録か テオフィリンIgGと置換し、実施例15Aの記載と同一 られた強度のたったの13%であった。 は、抗-テオフィリンを使用した時に使用した場合に得 m、に最強ピークが知見された。これらのピークの強度 たが、ワーザー波以488nmに由来するファンシフト1410c ら、幾つかのピークが染料に帰属されることが知見され この実験に於いては、同一濃度で抗-連鎖球菌IgGを抗-

【実施例15C】

[1110]

ラマンシフト1410cm に最強ピークが知見された。これ この実験に於いては、実施例15Aの記載と同一の遺皮 らのピークの強度は、BSA-テオフィリン接合体を使用し ることが知見されたが、レーザー被長488nmに由来する **ペクトルの記録から、幾しかのピークが染料に帰属され** BSA-テオフィリン接合体の代わりに使用した。ラマンス 及び条件下で、BSAを、抗-テオフィリン抗体と併用した た場合に得られた強度のたったの16%であった。 [0112]

コロイドの不安定化を避けるために、コロイドは、染料 いで染料の順次添加の代わりに使用し得る。染料による の希薄(1 μg/m1未満)溶液でオーバーコートし得 の添加消に、他の蛋白質(例えば、ウシ血清アルブミ ドを製造でき、この試薬を実施例15Aでコロイド、次 ン)または市販の界面活性剤(Tween 20若しくはBrij 3 ~0.5mlを混合することにより染料-標識化金属コロイ 【実施例15D】20μg/ml染料溶液5μlとコロイド1

[0113]

【実施例16】

拮抗様式を使用するテオフィリンの洗浄なしイムノアッ

試験管に添加し、渦巻かせながら混合し、続いて実施を 施例7 a でに限した20 μ IBSA-テオフィリン接合体を各 各試験管に入れて、室温で30分インキュベートした。実 コート100μ1サンプルを試験管中に入れた。実施例7 a 6、2.8、0.55及び0.0μg/mlで溶解した。各濃度のアリ で記載したヒツジ抗-テオフィリンのアリコート14μ1を テオフィリンを、0.02%クエン酸塩中、140、70、30、

特開平6-174723

(15)

能基に帰属される1410cm.のラマンシフトに於けるピー 面-強化ラマンスペクトルを記録した。染料のジアゾ官 を添加した。1分以内にサンプルをラマン分光:計に、設置 15 A に記載の如く銀コロイド0.5ml及び染料溶液 5 μ l 験サンプル中に存在するテオフィリン濃度の関数として クの相対強度を測定し、図10に示すようにコロイド試 プロットした。 488mm励起のアルゴンイオンレーザーを使用して表

[0114]

ビオチニル化ウシ血清アルブミンと4-ジメチルアミノア ン-BSA-DAB)の製造、接合体の略号(ビオチン-BSA-DA ブベンゼン-4' -イソチオシアナートとの接合体(ビオチ

hadex G-25 (荒い) カラム (1×30cm) で既猶した。 ート20μ1を添加した。混合物を一晩撹拌し、次いでSep から購入) (2mg) を1%NaHCO、pH8.6 (2ml) に溶解し、ジメチルホルムアミド中の1mg/ml 4-ジメチルアミ ビオチニル化ウシ血消アルブミン(Sigma Chemical Co. ノアンベンゼン-4 -インチオシアナートの溶液のアリコ 23

【沃梅室18】

SERRSによるビオチニル化ウシ血清アルブミン (BSA) の ストレプトアビジンー被覆銀コロイドへの結合阻害の洗

試験管24本全部を37°Cで45分インキュベートした。クエ オチンのアリコート12μ1を12本の試験管に添加した。 暴露サンプルとの間の違いを、添加したビオチンーBSA チンと接触させなかったものよりも弱いシゲナルを示し 記録した。遊離ビオチンに前暴露したサンプルは、ビオ 個ずしの1 mlサンプルに添加して、SERRSスペクトラを た。希釈したビオチニル化BSA-DAB接合体溶液の各 $100\,\mu$ ビオチニル化BSA-DAB接合体の6種類の希釈液を製造し ン酸中、12.5、25、50、75、100及び125μg/mlの濃度で ラス製試験管に入れた。クエン酸緩衝液中の4.4mg/mlビ 複"したコロイドを24個のアリコートに分け、小さなガ ベートした。インキュベーション後、"アバジンー被 1,408μ1)を37℃で1時間銀コロイド24m1とインキュ ストレプトアビジン(0.02%クエン酸緩衝液中0.1mg/m DABの濃度の関数としてプロットした。結果を図11に た。2個の値を平均し、ビオチンー前暴露サンプルと未 暴露したアビジン被覆コロイドの両方にひきそれぞれ2 1を、アビジン被覆したコロイドと、遊蝶ピオチンに前 ఆ

[0116]

【実施例19】

抗-HBsAgは、0.5×4cmニトロセルロース試験片の中央 する。この試験片の底部を、HBsAgの所定量を含むヒト の位置に国定化する。プロッターを試験片の上端に国定 膜上に於けるB型肝炎表面抗原(HBsAg)SERRSアッセイ 5

> 片上に固定化されている位置付近に局在化する。これ は、毛細管作用により固定化抗体を通り越すように上れ するので、サンブル中のHBsAgは固定化抗-HBsAg抗体に する、ニトロセルロースに固定化した抗-HBsAgの間のり は、コロイド-固定化抗-ビオチン抗体に結合するビオチ よい。コロイド粒子-染料-抗体鉛体は、抗-IBaAgが試験 を含む金属コロイドで処理する。あるいは、標識染料 抗体10 μ 1及び強いSERRSスペクトルを示し得る標識染料 抗体(補助の特異的部位)及び表面固定化抗-ビオチン より捕獲される。次に、2μ1/mlビオチニル化抗-HBsAg 血漿120μ1からなるサンプルと接触させる。サンブル SERRSスペクトルを測定することにより検出される。 の存在及びには、試験片中央の上記の位置の染料標識の ガンド結合反応を介して起こる。被分析物質 (HBsAg) ニル化抗-HBsAgに結合する被分析物質(HBsAg)に結合 を、金属粒子に固定化した抗-ビオチン抗体につけても [0117]

【実施例20】

イドに於けるSERRSのデモンストレーション 硝酸銀のクエン酸塩及び水素還元により製造した銀コロ

ロイドとも、ラマンシフトピークに関して同一SERRSス ナトリウムで硝酸銀を還元して製造したもので、他方の れるようにコロイド製造に於ける遠いを幾らか示してい ペクトルを示したが、相対ピーク強度は、図12に示さ コロイドは、硝酸銀を水素還元して製造した。両方のコ ドの各サンプルに加えた。一方のサンプルは、クエン酸 対1の希釈弘合溶液を水中で製造した。等量を銀コロイ オキサジン725染料と退合したメチレンブルー染料の20

[0118]

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) のSERRSアッセイ 【実施例21】

る。インキュベーション後、各混合物を吸着パッドによ 標識が結合する。全結合量は存在するECG量に依存す 体を介して接合体に結合し、これにより、粒子にラマン 体を介して粒子に結合し、 α -サブユニットは抗- α -抗 の間に、存在するHCGのβサブユニットは固定化抗-β抗 捕獲試薬-接合体混合物のアリコート100μ1と混合し U.を含む6種類の各試験サンプルから取り出し、各々を と混合した。50 µ1アリコートを各々、HCG 0~200ml 1クエン酸緩衝液、pH7.4で希釈して濃度0.05%とし、同 2の抗体につけて接合体を形成した。捕獲試薬を0.01mo たSERRSスペクトルを示し得る標識染料(ジメチルアミ バーコートし、非-特別的結合を抑制した。はっきりし 捕獲試薬を製造した。粒子を乾燥ミルク0.1%溶液でオー 特異的な抗体を、50nmコロイド銀粒子表面に固定化し、 ヒト銭 H 在 ゴナドトロピン (HCG) の β サブユニットに **―クエン酸緩衝液中、濃度20μg/mlで接合体を含む溶液** ノアゾベンゼン)をHCGのα-サブユニットに特異的な第 次いで混合物を室温で30分インキュベートした。

(16)

SERRSスペクトルを表示させるのに十分な光を照射する 体を保持している。次いで、捕獲標識分子にSERSまたは HCG被分析物質を介してこれらに結合した粒子及び接合 を介して下の吸着パッドに吸引する。フィルタ表面は、 り支持されているフィルタからなる別個のフィルタアセ 果をさらに増幅し得る。 と、フィルタ表面の粒子が密に充填しているので強化効 ンプリに適用し、未結合接合体を含む液体は、フィルタ

例示及び説明するためのものである。本発明の範囲はこれらによって限定されず、付記請求項及びその均等物に 付記請求項によって定義される本発明の範囲に含まれ ましい態様の種々の変形及び改質が可能である。このよ うな改質及び変形は、本発明を逸脱するものではなく、 よって定義される。当業者には、上記教示の範囲内で好 【0119】前述の本が別の好ましい態模は、本発別の

【図面の簡単な説明】

表面を、相面試験機で探査した際の針入状況を示す図で 【図1】作成した状態での化学的に沈積した銀フィルム 20

助尼波区,457.9nm. イルムの非-存在下での2,4-ジニトロベンゼン、10⁻³ M スペクトル獲得条件:獲得時間、19秒:電力, 41mW 4倍に拡大した)のラマンスペクトルを示す図である。 沈積した銀フィルムの存在下での2,4~ジニトロフェニル の5',4-ジニトロベンガン溶液、10° M、(B) 行が思言 -BSA接合体、10 M (DNP部分に関して) 、 (C) 銀フ 【図2】(A)化学的に沈積した銀フィルムの存在下で (特徴をはっきりさせるために A 及び B に対して縦軸を

||14, 100秒: 北力, 50mW; 随起被反, 457.9nm ビジン吸着表面(C)からは、この領域では識別可能な SERRSスペクトルを示す図である。HABAの非-存在下のア ュベートした化学的に沈積した銀フィルムから得られた 中で製造したアビジンの2.5×10。M溶液、中でインキ スペクトルは無かった。スペクトル獲得条件:獲得時 【図4】DAB-抗-TSH抗体接合体を使用するTSH抗原の 【図3】(A)HABAの3mM溶液及び、(B)HABAO.3mM

含む溶液中で捕獲抗体一被覆電極をインキュベートし、 ル。プロット (B) 、 (C) 、 (D) 、 40μg/m1溶液に移した。 (A) 銀表面の非-存在下でのI 原でインキュベートし、次いでDAB-抗-TSH抗体接合体の 抗-TSH捕獲抗体で被覆した銀電極を種々の濃度のTSH抗 的なSERRSスペクトルの混合プロットを示す図である。 次いでDAB-抗-TSH抗体接合体の40μg/ml溶液に移して得 AB-抗-TSH抗体接合体の40μg/ml溶液のSERRSスペクト (F) は、各々、TSH抗原を0、4、10、25及び60μIU "サンドイッチ"イムノアッセイに於いて得られた典型

特開平6-174723

示す図である。値は、銀電極上の5つの異なる場所から 平均) である。 した被分析物質の各濃度に関する変動係数(標準偏差/ 1本の電極を使用した。括弧内に挿入した数字は、 得、平均したものである。測定した各TSH抗原濃度毎に として、1410cm に於ける平均SERRS強度のプロットを 【図5】既知のTSH標準試料に関するTSH抗原濃度の関数

5 の測定の平均を表す。括弧内に挿入した数字は、 SH抗原濃度を示す図である。各データポイントは、 た各TSH抗原濃度毎の変動係数(標準偏差/平均)であ 【図6】市販の酵素イムノアッセイキット(Abott Labs No.6207)の点葉を使用して得られた吸収(492mm)対T

ペクトルを示す図である。 よって得られたスペクトルの近 I R励起を用いるSERSス チルアミノアゾベンゼンウシ血清アルブミン接合体の上 **ゼンウシ血消アルブミン接合体の、別側に測定し、銀表** 記溶液中にプランクと同じ銀フィルムを浸漬することに 面の非-存在下で実施した溶液状態のスペクトルに加算 した**ブ**ランクの銀フィルムのスペクトル、(上)p-ジメ 【図7】(下)20mg/mlでp-ジメチルアミノーアンベン

取値を示す図である。 ッセイ及び、HCG濃度の関数としてプロットしたSERRS読 ゴナドトロピン (HCG) の標準試料の洗浄なしイムノア ボーター分子を用いてブタ血清中で製造したヒト絨毛性 【図 8】 金コロイド、クレシルバイレット染料またはリ

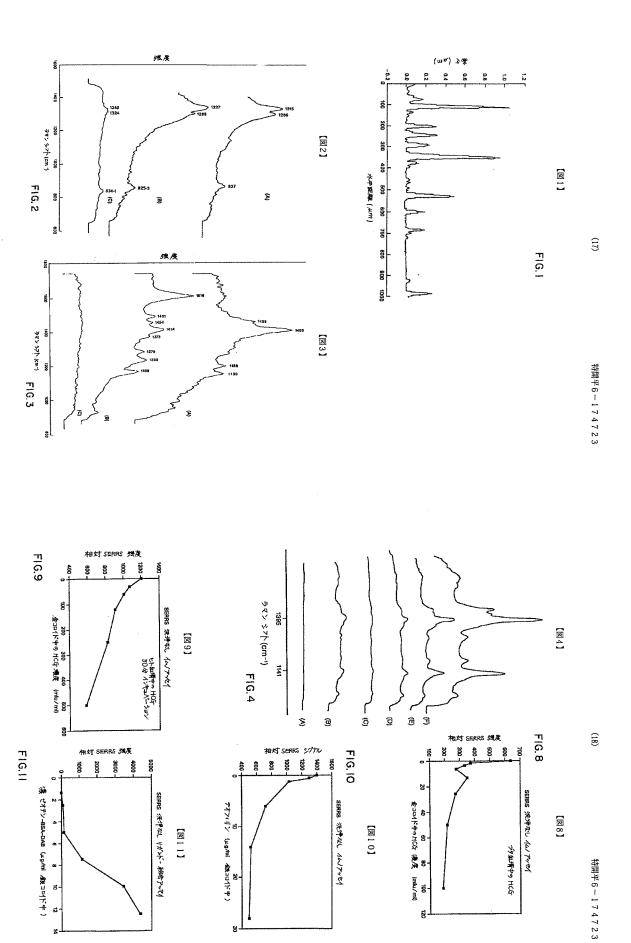
セイ及び、HCG濃度の関数としてプロットしたSERRS読取 ポーター分子を用いてヒト血清中で製造したヒト絨毛性 値を示す図である。 ゴナドトロアン(HCG)の該急減速の第2なフイムノアッ 【図9】金コロイド、クレシルバイレット染料またはリ

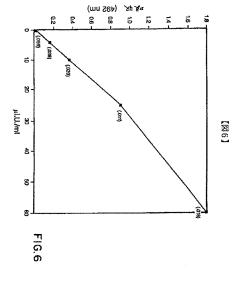
ಆ

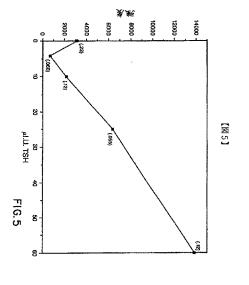
ロットしたSERRS読取値を示す図である。 ルフィド染料またはリポーター分子を用いて、クエン酸 イムノアッセイ及び、テオフィリン鎧皮の因数としてフ 緩衝液中で製造したテオフィリンの標準試料の洗浄なし ベンジル-4-チオカルバモイルエチルアミノエチルジス 【図10】銀コロイド、N,N-ジメチルアコリン-4-アソ

たウシ血清アルブミン[完全な接合体の略号はビオチン アゾベンゼン(DAB)]、及びビオチンの両方に接合し 阻害の洗浄なしの検出を示す図である。 ソー被覆銀コロイドに対する遊離ビオチンによる結合の てプロットしたSERRS読取値による、ストレプトアビジ -BSA-DABである}の、ビオチン-BSA-DBA濃度の関数とし 【図11】染料またはリポーター分子 [ジメチルアミ.

マン散乱(SERRS)スペクトルを示す図である。 ンブルー:オキサジン725の20:1混合物の表面-強化ラ **塩のいずれかを用いて製造した、銀コロイド上のメチレ** 【図12】還元剤として(A)水素及び(B)クエン酸

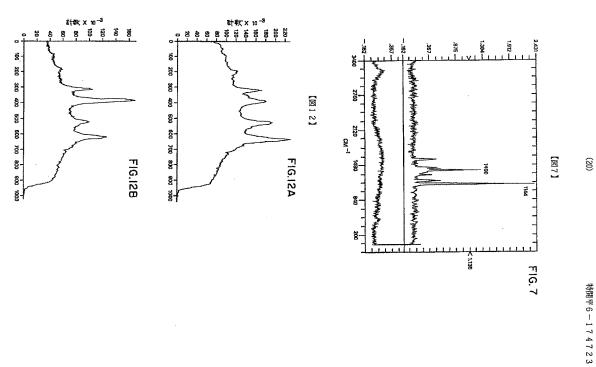






(19)

特開平6-174723



フロントページの続き

(72)発明者 ジエイムス・ジエイ・マーカス アメリカ合衆国、イリノイ・60515、ダウ ナーズ・グロウブ、サーティーシツカス ス・ストリート・550

(72)発明者 テレーゼ・コットン アメリカ合衆国、アイオワ・50010、エイ ムズ、ユタ・ドライブ・4134(72)発明者 バーナード・ロスペンドウスキ イギリス国、スコットランド・ジー・32・ 9・エル・ジー、グラスゴウ、サンディー ヒルズ、サンディーヒルズ・ドライブ・20